

Braunschweigische  
Wissenschaftliche Gesellschaft

# Jahrbuch 2015

Sonderdruck  
Seiten 187–193



J. CRAMER Verlag • Braunschweig  
2016

# KLASSENSITZUNGEN

## Lasermikroskope sehen Moleküle ziemlich scharf\*

K.-H. GERICKE

Institut für Physikalische und Theoretische Chemie, Technische Universität  
Braunschweig, Hans-Sommer-Str. 10, D-38106 Braunschweig,  
E-Mail: k.gericke@tu-braunschweig.de

Es ist ein Wunschtraum der Biologen, aber auch der Materialwissenschaftler, Methoden an der Hand zu haben, die den Nachweis von molekularen Substanzen und deren Wechselwirkungen mit anderen Komponenten ohne Eingriff in die natürliche Matrix des Systems ermöglichen. Wegen ihrer hohen Sensitivität und chemischen Selektivität, sowie der Möglichkeit Untersuchungen in mikroskopischen Bereichen durchzuführen, sind insbesondere laseroptische Methoden geeignet.

Bei dieser Technik wird ein Laserstrahl durch ein Mikroskopobjektiv fokussiert und das auftretende Fluoreszenzlicht wird vom selben Objektiv gesammelt und nach spektraler Abtrennung vom anregenden Licht von einem Detektor registriert. Verschiebt man nun rasterartig den Laserstrahl, dann erhält man ein zweidimensionales Bild der Probe. Durch geschicktes Einbringen von Blenden im abbildenden Okular oder durch die besondere Technik der Zweiphotonenanregung kann auch in der Tiefe einer Probe ein Bild aufgenommen werden, so dass es schließlich möglich ist, dreidimensionale Bilder zu erhalten.

In der Biologie, aber auch in den Materialwissenschaften, ist man verständlicher Weise gerade an Prozessen interessiert, die im Inneren ablaufen. Daher hat sich die Zweiphotonenanregung durchgesetzt, da bei dieser Technik eine Tiefenauflösung intrinsisch verankert ist und die verwendete Wellenlänge im nahen Infraroten besonders für biologische Proben geeignet ist, weil diese schwächer absorbiert werden als die Wellenlängen im grünen oder blauen Spektralbereich. Bei der Zweiphotonenanregung werden simultan zwei Photonen gleichzeitig vom Molekül absorbiert (wobei die „gleichzeitig“ im Rahmen der Heisenbergschen Unschärferelation zwischen Energie und Zeit,  $\Delta E \cdot \Delta t > \hbar/4\pi$ , festgelegt ist). Statt mit blauem Licht bei 400nm anzuregen, wird mit Photonen bei 800nm angeregt. Damit ein solcher Prozess überhaupt stattfindet, müssen sehr viele Photonen in

---

\* Der Vortrag wurde am 13.02.2015 in der Klasse für Mathematik und Naturwissenschaften der Braunschweigischen Wissenschaftlichen Gesellschaft gehalten.

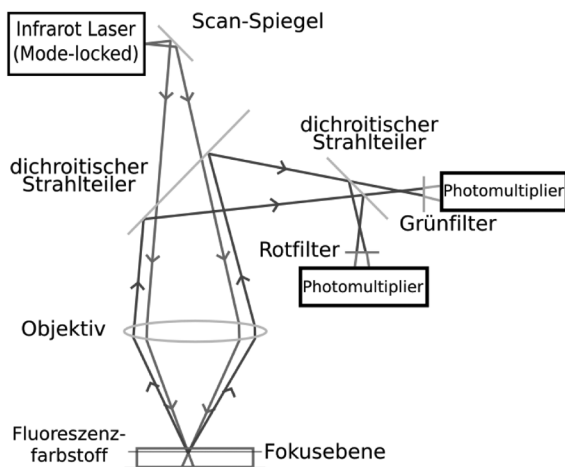


Abb. 1: Ein Laserstrahl wird über das Objektiv eines Mikroskops auf die zu untersuchende Probe fokussiert. Das emittierte Fluoreszenzlicht wird vom selben Objektiv gesammelt und nach spektraler Auftrennung durch einen dichroitischen Strahlteiler von Detektoren registriert. Bei der sogenannten Zweiphotonenanregung verwendet man einen Femtosekundenlaserpuls im nahen Infraroten (800nm) und das Fluoreszenzlicht tritt dann oberhalb der halben Wellenlänge ( $>400\text{nm}$ ) im blauen Spektralbereich auf.

möglichst kurzer Zeit auf das Molekül einwirken, d.h. man muss einen gepulsten Laserstrahl verwenden und diesen fokussiert auf die Probe lenken. Nur im Fokus ist die Strahlintensität ausreichend hoch, um die Moleküle anzuregen, d.h. die Ausdehnung des Fokus bestimmt automatisch die Auflösung in der Ebene, aber eben auch in der Tiefe. So erhält man einen Bildpunkt im dreidimensionalen Rasterfeld<sup>1</sup>.

Ein Beispiel ist die Abbildung 2, die das Gehirn einer lebenden Maus in verschiedenen Tiefen zeigt. Durch geeignete Software sind so Bildschnitte unter beliebigem Winkel sichtbar zu machen. Damit überhaupt Fluoreszenz auftritt, ist es häufig nötig, geeignete Farbstoffe zu verwenden. Ein großer Durchbruch gelang durch die Entdeckung des GFP, das Green Fluorescent Protein. Für die Aufnahme in Abbildung 2 wurde die Maus so genetisch verändert, dass sie eine Variante vom GFP, das yellow fluorescent protein EYFP, produziert. Dieses be-

<sup>1</sup> S. Denicke, J.-E. Ehlers, R. Niesner, S. Quentmeier, and K.-H. Gericke, Steady-state and time-resolved two-photon fluorescence microscopy: a versatile tool for probing cellular environment and function; Phys. Scr. **76** (2007) C115-C121.

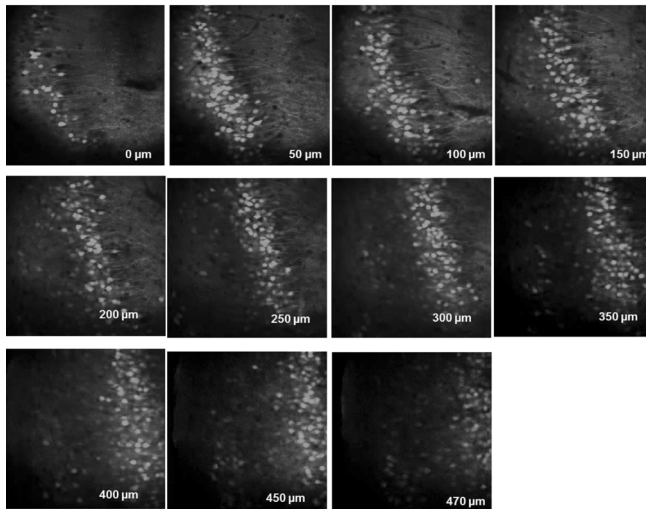


Abb. 2: Das Gehirn einer lebenden Maus in verschiedenen Tiefen. Ein Einzelbild zeigt  $400 \times 400 \mu\text{m}^2$ . Die Anregung fand bei 920nm, das Fluoreszenzmaximum liegt um bei 535nm (verursacht durch das yellow fluorescent protein EYFP).

sitzt ein Fluoreszenzmaximum im grünen Spektralbereich und kann mit Zweiphotonen um 920 nm angeregt werden.

Es können auch unterschiedliche Moleküle mit der gleichen Laserstrahlung angeregt werden. Sofern diese Moleküle bei unterschiedlichen Wellenlängen emittieren, können sie mit Hilfe von Farbfiltern getrennt beobachtet werden. Ein Beispiel hierzu zeigt die Abbildung 3, die einen wichtigen Prozess der Immunabwehr *in vitro* illustriert. Die rot eingefärbten Zellen des Immunsystems (Bild Mitte) bekämpfen die grün eingefärbten „Eindringlinge“ (oben links) und „fressen“ diese (unten rechts). Tatsächlich sind die Aufnahmetechniken so schnell, dass dieser Prozess in einem Film zeitlich aufgelöst beobachtet werden kann.

Durch Messung der Fluoreszenzlebensdauer können weitere wichtige Zellparameter bestimmt werden, wie Ca-Ionenkonzentration, Viskosität, pH-Wert oder Temperatur. Darüber hinaus erlaubt die Beobachtung der Polarisation Aussagen über die Bewegung der Moleküle im Umfeld einer Zelle oder aber auch die Haftung bzw. Restbewegung an Oberflächen<sup>2</sup>.

<sup>2</sup> R. Niesner, B. Peker, P. Schlüsche, K.-H. Gericke, C. Hoffmann, D. Hahne, and C. Müller-Goymann, 3D-Resolved Investigation of the pH Gradient in Artificial Skin Constructs by Means of Fluorescence Lifetime Imaging, *Pharmaceutical Research*, 22 (2005) 1079-1087

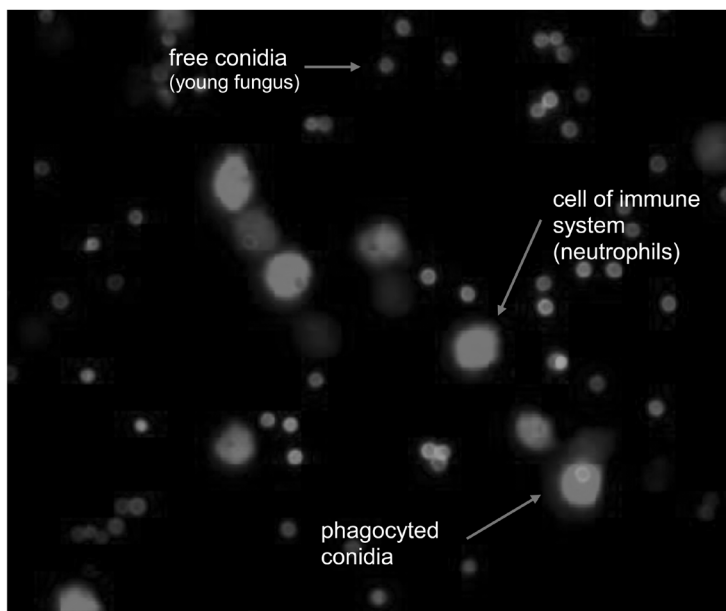


Abb. 3: Mit Hilfe eines spektralen Filters kann in die Emission unterschiedlicher Moleküle aufgetrennt werden, um so beispielsweise Prozesse unseres Immunsystems zeitlich aufzulösen.

Technisch einfacher lassen sich einzelne (Farbstoff-) Moleküle beobachten. Ein Beispiel hierfür ist in Abbildung 4 dargestellt. Ein kontinuierlicher unfokussierter Laserstrahl regt die Moleküle an und eine empfindliche Kamera hinter einem Mikroskop detektiert die Fluoreszenz. Tatsächlich kann man sogar die molekulare Diffusion live beobachten<sup>3</sup>.

Begrenzt werden alle vorgestellten Methode durch den Wellencharakter des Lichtes, oder präzisiert durch Beugungserscheinungen. Danach sind die Grenzen der lateralen Auflösung grob durch die halbe Wellenlänge des Laserlichts gegeben. D.h. ein „grüner“ Laserstrahl um 500 nm ermöglicht die Erkennung von Strukturen bis hinab zu ca. 250 nm. Im letzten Jahrzehnt sind Techniken entwickelt worden, die diese Auflösungsgrenze zu deutlich kleineren Strukturauflösungen verschoben haben.

<sup>3</sup> E.C. Heider, M. Barhoum, K. Edwards, K.-H. Gericke, and J.M. Harris, Fluorescence Microscopy to Determine Distributions of Size and Lamellarity of Individual Phospholipid Vesicles, *Analyt. Chem.* (2011) 83 4909.

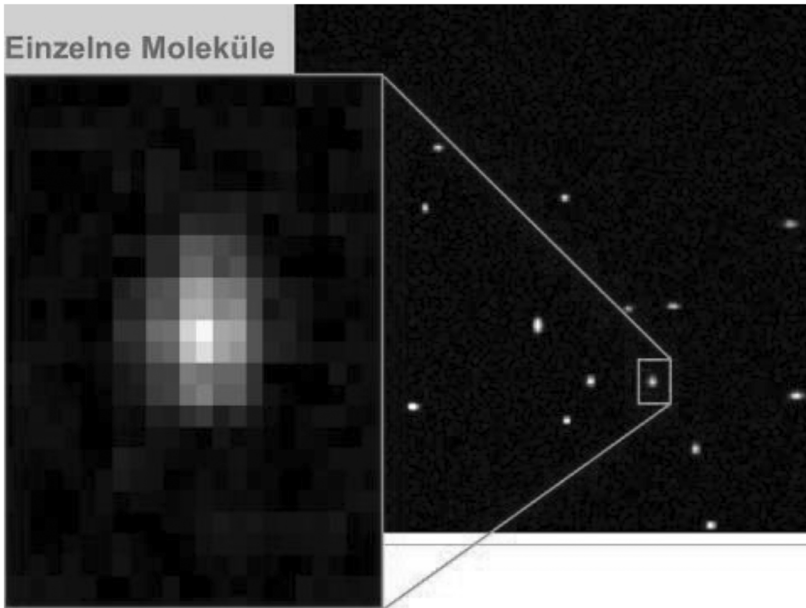


Abb. 4: Ein heller Bildpunkt gibt ein einzelnes Molekül wieder. Die Fleckgröße ist bei sich nicht stark bewegenden Molekülen durch das Auflösungsvermögen des Mikroskops festgelegt. Die genaue Position des Moleküls ist durch das Maximum der Helligkeitsverteilung gegeben. Durch Anpassen der Helligkeitsverteilung an eine 2D-Gaussverteilung kann so die Position auf wenige Nanometer genau bestimmt werden.

Der vergrößerte Ausschnitt der Abb.4 zeigt dabei bereits eine prinzipielle Möglichkeit auf: Vorausgesetzt, dass man tatsächlich nur ein Molekül beobachtet und dieses auch seine Position während der Beobachtung nicht wesentlich ändert, dann kann man die Helligkeitsverteilung näher analysieren. Diese wird durch eine Besselfunktion beschrieben. Da der Hauptanteil der Fluoreszenz aber grob einer Gaußfunktion entspricht, fittet man einfachheitshalber eine zweidimensionale Gaußverteilung an die Intensitätsverteilung an. Das Maximum der so gewonnenen Gaußschen Glockenkurve entspricht der Position des Moleküls. Da die Unsicherheit dieses Maximums mit der Wurzel der detektierten Photonen abnimmt, muss man beispielsweise bei einer Verbesserung der Auflösung um den Faktor zehn 100 mal mehr Photonen einstrahlen.

Der Nobelpreis in Chemie wurde 2014 an Eric Betzig (Janelia Research Campus, Howard Hughes Medical Institute, Ashburn, VA, USA), Stefan W. Hell (Max Planck Institute for Biophysical Chemistry, Göttingen, and German Cancer Research Center, Heidelberg, Germany) und an William E. Moerner (Stan-

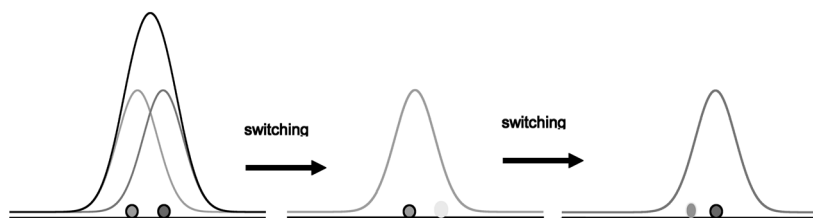


Abb. 5: Durch Ein- und Ausschalten der Fluoreszenz benachbarter Moleküle gelingt es, dass nur ein einzelnes Molekül leuchtet und durch Anpassung an dessen Helligkeitsverteilung kann die Position dieses Moleküls genau bestimmt werden.

ford University, Stanford, CA, USA) für die Entwicklung der supraauflösenden Fluoreszenz-Mikroskopie vergeben<sup>4</sup>.

Betzig und Moerner gelang es, die Fluoreszenz eines Farbstoffmoleküls (einer Variante von GFP) aus- und wieder anzuschalten. Mit Licht der Wellenlänge von 488 nm bestrahlt, leuchtet das Molekül – allerdings erlischt es bald und lässt sich auch durch weitere Anregung mit diesem Licht nicht wieder erwecken. Ein Lichtpuls um 405 nm „reaktiviert“ wieder das Molekül, so dass es bei Anregung um 488 nm wieder für eine Weile aufscheint. So kann man Moleküle ausschalten, um sicherzustellen, dass die Fluoreszenz nur von einem Molekül stammt (Abb.5)<sup>5</sup>. Die oben beschriebene Anpassung einer Gaußkurve an die Fluoreszenzintensitätsverteilung des Moleküls ergibt dann dessen Position mit einer Auflösung, die wesentlich besser ist als die der gewöhnlichen Auflösung (dies ist die Breite der Intensitätsverteilung, resp. Gaußkurve).

Da es für diese Methode essentiell ist, dass nur ein einzelnes Molekül im Beobachtungsbereich emittiert, ist der Preis für Verbesserung des mikroskopischen Auflösungsvermögens Zeit und viele eingestrahlte Photonen.

Stefan Hell hat eine andere Methode entwickelt, um die Fluoreszenz eines Moleküls zu unterdrücken: das von ihm so genannte STimulated Emission Depletion (STED) (Abb.6)<sup>6</sup>. Dabei benutzt Hell neben dem Anregungspuls (blau in Abb.6) einen zweiten Laserpuls (orange in Abb.6), der die Emission aus dem angeregten Zustand stimuliert, so dass keine Fluoreszenz mehr auftreten kann. Der besondere Trick ist die Intensitätsverteilung dieses „Depletion“-Pulses (Abb.6 rechts): Nur im Zentrum ist die Intensität Null, während sie vom Zentrum aus quadra-

<sup>4</sup> [http://www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/chemistry/laureates/2014/](http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2014/)

<sup>5</sup> Betzig et al., Science 2006; Rust et al., Nat. Meth. 2006; Hess et al. Biophys. J. 2006

<sup>6</sup> T. A. Klar, S. Jakobs, M. Dyba, A. Egner, and S. W. Hell, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (PNAS), 97, 8206-8210 (2000)

## STimulated Emission Depletion

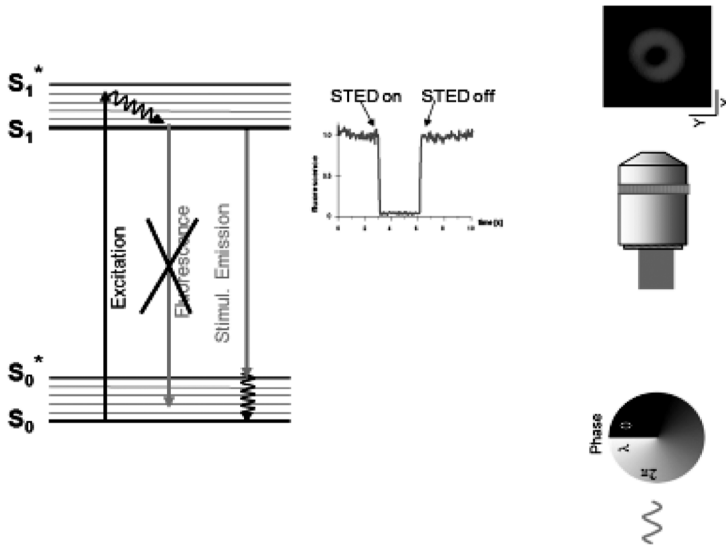


Abb.6: Um das Auflösungsvermögen eines Mikroskops zu erhöhen, wird der Anregungspuls (blau) von einem sogenannten Depletionpuls (orange) überlagert. Dieser Depletionpuls induziert einen Übergang, so dass keine Fluoreszenz (grün) auftritt. Allerdings ist die Intensitätsverteilung dieses Depletionpulses so gewählt, dass in dessen Zentrum kein Licht ist (also hier Fluoreszenz auftritt), die Intensität aber radial quadratisch zunimmt und damit die Fluoreszenz unterdrückt.

tisch zunimmt. Bei genügend hoher Intensität dieses Pulses wird daher nur Fluoreszenz im engen Zentrum dieses Pulses auftreten können. Grundsätzlich kann dieser Bereich und damit die Auflösung beliebig klein gehalten werden. Der Preis ist aber eine extrem hohe Laserleistung, die u.U. die Probe zerstören kann.